

Aus dem Klinisch-chemischen Labor (Leiter: Prof.Dr. T.O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik, Marburg/Lahn
(kommissarischer Direktor: Prof.Dr.H.Solcher)

ISOLIERUNG VON GLYKOSAMINOGLYCANEN AUS MENSCHLICHEM URIN MITTELS
GELCHROMATOGRAPHIE UND CSCI-GRADIENTENZENTRIFUGATION

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

des Fachbereiches Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

HANS WERNER TIMMERS

aus Essen

Marburg 1977

Aus dem Klinisch-chemischen Labor (Leiter: Prof.Dr. T.O. Kleine)
der Universitäts-Nervenlinik, Marburg/Lahn
(kommissarischer Direktor: Prof.Dr.H.Solcher)

ISOLIERUNG VON GLYKOSAMINOGLYCANEN AUS MENSCHLICHEM URIN MITTELS
GELCHROMATOGRAPHIE UND CSCL-GRADIENTENZENTRIFUGATION

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

des Fachbereiches Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

HANS WERNER TIMMERS

aus Essen

Marburg 1977



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. Neurath

Referent: Prof. Dr. T.O. Kleine

Correferent: Prof. Dr. Sturm

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
1. E i n l e i t u n g	1
2. M e t h o d i k	2
2.1. U r i n s a m m l u n g	2
2.2. A u f b e r e i t u n g d e s U r i n s	2
2.2.1. L y o p h i l i s a t i o n d e s U r i n s	2
2.2.2. E x t r a k t i o n d e s g e t r o c k n e t e n U r i n s	3
2.3. F r a k t i o n i e r u n g d e s U r i n e x t r a k t s m i t t e l s G e l c h r o m a t o g r a p h i e	4
2.3.1. M a t e r i a l i e n	4
2.3.2. G e r ä t e	4
2.3.3. V e r s u c h s t e c h n i k	4
2.4. A u f t r e n n u n g d e r U r i n f r a k t i o n e n m i t t e l s C s C l - D i c h t e z e n t r i f u g a t i o n	6
2.4.1. V o r b e r e i t u n g d e r P r o b e n	6
2.4.2. C s C l - D i c h t e z e n t r i f u g a t i o n	7
2.5.1. E n t s a l z e n v o n U r i n f r a k t i o n e n	7
2.6. B a u s t e i n a n a l y s e n	8
2.6.1. B e s t i m m u n g v o n U r o n s ä u r e n m i t t e l s d e r C a r b a z o l - R e a k t i o n	8
2.6.2. B e s t i m m u n g v o n Z u c k e r m i t t e l s d e r O r c i n o l - M e t h o d e	9
2.6.3. B e s t i m m u n g v o n A m i n o z u c k e r m i t t e l s d e r E l s o n - M o r g a n - R e a k t i o n	9
2.6.4. B e s t i m m u n g d e s G e s a m t p r o t e i n s m i t t e l s d e r B i u r e t - R e a k t i o n m o d i f i z i e r t n a c h (2 o)	11
2.6.5. B e s t i m m u n g v o n S u l f a t e s t e r n m i t t e l s d e r B e n z i d i n - R e a k t i o n	12
2.6.6. M e s s u n g v o n K r e a t i n i n i m U r i n	13
3. E r g e b n i s s e	14
3.1. Z u s a m m e n s e t z u n g u n d A u s b e u t e v o n B e s t a n d t e i l e n d e s U r i n s	14

II

Seite

3.2.	Fraktionierung von Urinextrakt auf Sephadex G-75 und Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen	19
3.3.	Auftrennung und Charakterisierung von chromatographisch getrennten Urinfraktionen im CsCl-Dichtegradienten	25
4.	D i s k u s s i o n	40
5.	Z u s a m m e n f a s s u n g	42
6.	L i t e r a t u r	43

1. Einleitung

Im menschlichen Körper ist das Bindegewebe anteilmäßig stark vertreten: In minimal 10 kg Hautfeuchtgewicht und 100 g Knorpel dürften 10 g Glycosaminoglycane enthalten sein (vgl. 29), wie z.B.: Chondroitin-4-, -6-sulfate, Dermatansulfat, Keratansulfat, Heparansulfat und Hyaluronsäure. Von diesen Glycosaminoglycanen werden täglich im Mittel 10 mg im Urin ausgeschieden (29), was einen relativ schnellen Stoffwechsel dieser Substanzen anzeigt.

Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, die ausgeschiedenen Glycosaminoglycane des menschlichen Urins bzw. deren Abbauprodukte anzureichern und mittels Molekularsiebchromatographie zu isolieren. Zur weiteren Charakterisierung werden erstmals Dichtegradientenauftrennungen vorgenommen. Mittels dieser Methode wird ein ganzes Spektrum verschieden großer und schwerer Uronsäuren und Aminosucker enthaltender Verbindungen isoliert und teilweise charakterisiert.

2. M e t h o d i k

2.1. Urinsammlung

Bei der Urinsammlung handelt es sich um 24h Urine gesunder medikamentenfreier Personen männlichen Geschlechts verschiedener Altersgruppen. Zur Vermeidung bakterieller Zersetzung wird 10 mg Natrium-Azid (Fa. Merck, Darmstadt) pro 100 ml Urin zugesetzt. Es wurden drei Chargen mit je 5,0 l Urin folgender Altersgruppen gesammelt:

Charge I : 20 - 30 Jahre (n = 6)

Charge II : 10 - 20 Jahre (n = 4)

Charge III : 1 - 10 Jahre (n = 3)

Während der Sammelperiode wurde der Urin bei +4°C in verschlossenen Kunststoffflaschen aufbewahrt und unmittelbar aufgearbeitet oder bei -70°C eingefroren. Vor der Aufarbeitung des Urins wird ein Aliquot zur Bestimmung von Urinbestandteilen entnommen (2 ml).

2.2. Aufbereitung des Urins

2.2.1. Lyophilisation des Urins

Die Lyophilisation, eine der schonensten Methoden biologische Präparate zu trocknen, wird wie folgt durchgeführt: 5 l Urin einer Charge werden in Mengen à 100 ml in 1000 ml Schliffgrundkolben durch manuelles Drehen in einer Kühlflüssigkeit, bestehend aus Trockeneis und Aceton, eingefroren, wodurch eine möglichst große Oberfläche erreicht wird. Anschließend beginnt der Trocknungsvorgang im Gerät der Fa. WKF Gerätebau (Brandau). Die Vakuumskontrolle erfolgt mit einem Meßgerät der gleichen Firma. Die Rundkolben werden nach der Lyophilisation mit einem Metallspatel ausgekratzt. Die Trockenmasse wird bis zum Abschluß der gesamten Lyophilisation einer Charge in einem geschlossenen Gefäß bei +4°C aufbewahrt. Abschließend wird die Trockenmasse gewogen (220,5g $\pm$ 10,7g).

2.2.2. Extraktion des getrockneten Urins

220 mg Trockenmasse werden in 160 ml Puffer (0,4 M Guanidin-HCl 0,05 M Na-Acetat, pH 5,8) aufgenommen. Anschließend wird die Suspension 20 min bei 6000 Upm in einer Christzentrifuge bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Sediment erneut 15 min zentrifugiert, der Überstand wieder dekantiert. Dann wird das Sediment 6x mit je 20 ml Puffer aufgeschwemmt, jeweils 15 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Pro Waschgang wird ein Aliquot zur Bestimmung von Uronsäuren entnommen (siehe Abb. 1). Es entsteht ein Urin-Konzentrat (Extrakt) und Urin-Sediment (Rückstand), welche beide analysiert werden:

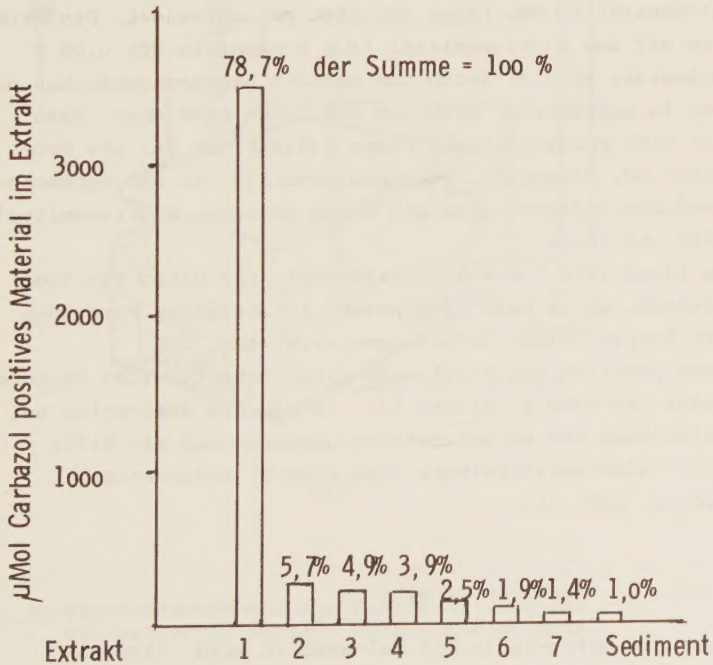


ABB. 1: EXTRAKTION VON URINTROCKENSUBSTANZ

2.3. Fraktionierung des Urinextrakts mittels Gelchromatographie

2.3.1. Materialien

Für die Gelchromatographie wurde Sephadex Typ G 75 mit einem Gelbettvolumen von 12-15 ml/g verwendet (Fa. Pharmazia, Frankfurt/M). Der ungefähre Trennbereich (M) liegt für Peptide und globuläre Proteine bei 3 000 - 70 000, für Dextranfraktionen bei 1 000 - 50 000 (13).

2.3.2. Geräte

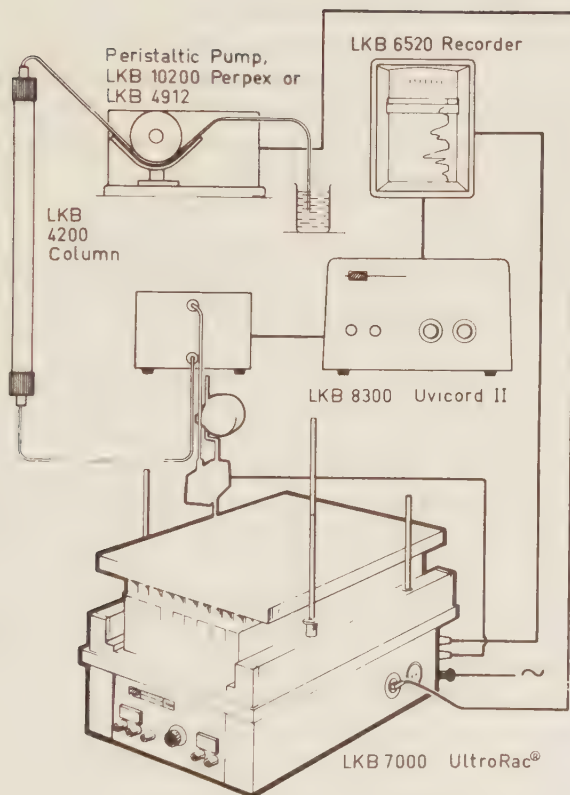
Es wird eine Säule der Fa. Serva mit Kühlmantel (innerer Durchmesser 50 mm, Länge ca. 1500 mm) verwendet. Die Probe wird mit dem Elutionsmittel (0,4 M Guanidin-HCl 0,05 M Na-Acetat, pH 5,8) durch das Gelbett hindurchgewaschen und zwar in umgekehrter Richtung von unten nach oben. Dazu wird eine peristaltische Pumpe (4912A) der Fa. LKB Produktor AB, Stockholm, Schweden benötigt. In der Versuchsanordnung befindet sich die Pumpe zwischen Elutionsmittelfäß und Säule.

Das Eluat wird zum Fraktionssammler (LKB Ultro Rac 7000) geleitet, wo es nach Tropfenzahl in einzelnen Portionen (300 Tropfen/Glas) aufgefangen wird (Abb. 2).

Davor passiert das Eluat noch einen Detektor (LKB Unicord I oder LKB 8300 A Unicord II), in dem die Absorption bei Wellenlänge 280 nm automatisch gemessen und mit Hilfe eines Fallbügelschreibers (LKB 6520-6) aufgezeichnet wird (s. Abb. 2).

2.3.3. Versuchstechnik

Bevor die Serva-Säule mit Gel gefüllt wird, läßt man Sephadex G 75 über 24h im Elutionsmittel (0,4 M Guanidin-HCl, 0,05 M Na-Acetat, pH 5,8) quellen. Dann wird die



A typical arrangement when using the UltraRac in a chromatographic system

Fig.7

Abb. 2: Versuchsanordnung zur Fraktionierung des Urinextraktes mittels Gelchromatographie

Säule mit einer Elutionsmittel-Gel-Suspension gefüllt, bis das Gelbett eine Länge von 1 400 mm erreicht. Das Gelbett kommt fest zwischen zwei poröse Platten zu liegen. Dadurch läßt sich die Probefüllung exakt auftragen, und ein Durchfluß in beiden Richtungen ist möglich. Man muß nun gut darauf achten, daß keine Luft in das Gelbett gelangt, da es sonst unbrauchbar wird. Elutionsmittel wird nun über 48h mit Hilfe einer Pumpe von unten nach oben durch die Säule geschickt. Die Versuchstemperatur beträgt $+4^{\circ}\text{C}$.

Eichung der Serva-Säule:

Bevor die Probe auf die Gelpackung gegeben wird, wurde die Säule mit folgender Eichlösung geeicht: Blue Dextran 2000 (Fa. Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden), 0,5 mg/ml M.G. $\sim$ 2 000 000,

Pepsin (doppelt kristallin, Fa. E. Merck, Darmstadt)

0,1 mg/ml. M.G. 35 500,

Cytochrom C (Fa. Boehringer Mannheim) 0,5 mg/ml M.G. 13 000,

AMP (Adenosin-5-monophosphat di-Natriumsalz, Fa. Boehringer Mannheim) 0,5 mg/ml M.G. 391,19, gelöst in Elutionsmittel.

Das Volumen der Eichprobe ist gleich dem Probenvolumen (=200 ml).

Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von $4 \text{ ml/cm}^2\text{h}$ durch das Gelbett wird fraktioniert. Die Abb. 3a zeigt das Verteilungsmuster der vier Eichsubstanzen für Sephadex G 75. Der Bereich V_0 (960 ml äußeres Volumen zwischen den Gelkörnern; s. Abb. 3a) wird verworfen, da er nur Elutionsmittel enthält. In gleicher Weise wurden nun mit jeweils 200 ml Probenvolumen Urinkonzentrat der Urinchargen I und II gefahren und verschiedene Urinfraktionen isoliert.

2.4. Auftrennung der Urinfraktionen mittels CsCl-Dichte-zentrifugation

2.4.1. Vorbereitung der Proben

Die mittels Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen bzw. Subfraktionen der Urinchargen I und II werden am Rotations-

verdampfer (Fa. Büchi, Flawil/Schweiz) bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Verhältnis 1 : 10 eingeeengt, Gewicht und Dichte ermittelt. Der pH 5,8 wird überprüft. Mit Hilfe von CsCl (Fa. Merck, Darmstadt) wird die Dichte genau auf 1,5 g/ml eingestellt. Von jeder Fraktion bzw. Subfraktion wird ein Aliquot zur Strukturanalyse entnommen.

2.4.2. CsCl-Dichtezentrifugation

Bei der Dichtegradientenzentrifugation erfolgt die Auftrennung im Schwerfeld in erster Linie aufgrund der Dichteunterschiede der Teilchen; sie verläuft somit weitgehend unabhängig von den übrigen Teilcheneigenschaften (z.B. deren Form) in einem Medium, dessen Dichte im Bereich der zu erwartenden Dichte der zu trennenden Teilchen liegt. Die Zentrifugation erfolgt nahezu bis zum Gleichgewicht (nach ca. 48h) in der Ultrazentrifuge der Fa. Beckman im Swing out Rotor SW 40 bei 36 400 RPM und 20°C in Cellulose-Nitrat-Röhrchen. Bei Beendigung des Laufes befand sich an der Oberfläche ein Proteinfilm, der entfernt werden mußte. Anschließend wurden die Zentrifugenbecher mittels fraktioniertem Absaugen im Auto-Densi-Flow (Fa. Buchler, USA) von oben nach unten mittels einer Perpex-Schlauchpumpe (6 Tropfen/min) entleert und im LKB Ultro Rac 24 Tropfen pro Glas (= 0,9 ml/Glas) gesammelt.

2.5.1. Entsalzen von Urinfraktionen

Die Urinfraktionen wurden auf Sephadex G-25 (2,5 x 60 cm Säulenvolumen) bei 4°C mittels bidest. Wasser entsalzt. Kontrolle mit Hilfe des Fallbügelschreibers. Anschließend wurde die Säule mit bidest. Wasser regeneriert bis die AgCl-Reaktion negativ war. Die entsalzten Unterfraktionen wurden dann gefriergetrocknet, in 3 ml bidest. Wasser aufgenommen und analysiert.

2.6. Bausteinanalysen

2.6.1. Bestimmung von Uronsäuren mittels der Carbazol-Reaktion

Die Uronsäuren in menschlichen Urinen wurden mittels der modifizierten Carbazol-Reaktion nach BITTER und MUIR (6) gemessen. Benötigte Reagenzien:

Schwefelsäure-Reagenz: 0,025M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ p.A.
(Fa. E. Merck, Darmstadt) in konzentrierter H_2SO_4 p.A.
($d = 1,84$) gelöst,

Carbazol-Reagenz: Carbazol (Fa. E. Merck, Darmstadt)
1,25 g/l in absolutem Äthanol p.A.,
Äthanol 96 %ig p.A.,

D-(+)-Glucurono-3,6-Lacton (5,68mM) als Standard in bidest.
Wasser gelöst (Fa. Baker, Groß-Gerau).

Ansatz für Probe: 5 ml Schwefelsäure-Reagenz, 1 ml Probevolumen, 0,2 ml Carbazol-Reagenz.

Da Urin eine hohe Eigenfarbe hat, wird je Probenansatz ein Probenleerwert angesetzt: 5 ml Schwefelsäure-Reagenz, 1 ml Probevolumen, 0,2 ml Äthanol.

Ausführung: Die im Eisbad vorgekühlten Reagenzgläser wurden mit je 5 ml kaltem Schwefelsäure-Reagenz und 1 ml Probevolumen (Doppelwerte) beschickt. Wegen der bei dieser Reaktion entstehenden Wärmeentwicklung wurden die Proben vorsichtig im Eisbad gemischt, anschließend genau 10 min. in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach Abkühlung mit Leitungswasser wurde 0,2 ml Carbazol-Reagenz bzw. 0,2 ml Äthanol zugesetzt; nach gründlichem Mischen kamen die Proben nochmals 15 min. in ein kochendes Wasserbad. Die Extinktion der entstandenen Rosafärbung wurde gegen den Probenleerwert mit dem Photometer-Eppendorf ($d = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 546 \text{ nm}$) gemessen. Eichmessungen mit einem Glucuronsäure-Lacton-Standard ergaben eine linear ansteigende Eichkurve zwischen 0,028 - 0,568 μMol .

Extinktionskoeffizient: $E_{\mu\text{Mol}} = 3,06E \frac{546 \text{ nm}}{d=1 \text{ cm}}$

2.6.2. Bestimmung von Zucker mittels der Orcinol-Methode

Zucker im menschlichen Urin werden mittels der Orcinol-Reaktion nach BROWN (7) bestimmt. Benötigte Reagentien: Orcinol-Reagenz: 4 g Orcin p.A. (Fa. Merck, Darmstadt) und 1,5 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ p.A., in 100 ml bidest. Wasser gelöst, werden mit 30 %iger HCl 1 : 20 verdünnt (vor Gebrauch neu ansetzen),

D-(+)-Glucurono-3,6-Lacton (33,73mM) als Standard in bidest. Wasser gelöst (Fa. Baker, Groß-Gerau).

Ansatz für Probe: 0,5 ml Probevolumen, 1,5 ml Orcinol-Reagenz.

Da Urin eine hohe Eigenfarbe hat, wird je Probenansatz ein Probenleerwert angesetzt. Beide haben den gleichen Ansatz. Ausführung: Vierfachwerte: zwei Proben- und zwei Probenleerwerte werden in Schliffkolben gegeben, verschlossen und gut gemischt. Anschließend werden die Gläser für 20 min. in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die Probenleerwerte werden nicht gekocht, sondern bleiben 20 min. bei Zimmertemperatur stehen. Nach Abkühlen der Proben unter Leitungswasser mißt man die Extinktion der Proben gegen die Probenleerwerte im Zeiss-Spektralphotometer bei $\lambda = 665 \text{ nm}$ und einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$. Die Färbung der Proben verliert stündlich 3 - 4 % an Intensität. Die Eichkurve ist linear für einen Glucuronsäure-Lacton-Standard bis zu 0,169 μMol .

Extinktionskoeffizient: $E_{\mu\text{Mol}} = 3,213 E \pm 0,035 \begin{matrix} 665 \text{ nm} \\ d=1 \text{ cm} \end{matrix}$

2.6.3. Bestimmung von Aminosucker mittels der Elson-Morgan-Reaktion

Durch saure Hydrolyse werden Aminosucker im menschlichen Urin freigesetzt und mittels einer modifizierten Elson-

Morgan-Reaktion bestimmt (ANTONOPOULOS C.A. et al., 2).

Benötigte Reagenzien:

37 %ige HCl p.A.

1,25N Na_2CO_3 x 10 H_2O p.A. in bidest. Wasser

Acetyl-Aceton-Reagenz: Acetyl-Aceton p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt) 3 g auf 100 ml 1,25N Na_2CO_3 gelöst.

Ehrlichs-Reagenz: 2,5 g p-Dimethyl-amino-benzaldehyd p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt) werden in 30 ml 37 %igem HCl p.A. und 30 ml 96 %igem Äthanol p.A. unter Kühlung gelöst.

Leerwert Reagenz: 30 ml 37 %ige HCl p.A. und 30 ml Äthanol 96 %ige p.A..

D-Glucosamin HCl p.A. (1,287 mM) als wäßriger Standard (Fa. Serva, Heidelberg).

Reaktionsansatz für Probe und Probenleerwert:

0,25 ml Probevolumen

0,5 ml Acetyl-Aceton-Reagenz

2,0 ml Äthanol p.A.

0,25 ml Ehrlichs-Reagenz

Ausführung: Proben und Probenleerwerte wurden in 37 %iger HCl sechs Stunden bei 100°C hydrolysiert (Gesamtvolumen: 1 ml), darauf in einem Rotationsverdampfer eingengt und in 1 ml bidest. Wasser aufgenommen. Nach erneuter Eingung wurden die in 0,25 ml bidest. Wasser gelösten Proben und Probenleerwerte mit 0,5 ml Acetyl-Aceton-Reagenz versetzt und 60 min. bei $90^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert, anschließend mit Leitungswasser gekühlt. Genau 30 min. nach Zusetzen von 2 ml Äthanol p.A. und 0,25 ml Ehrlichs-Reagenz zu den Proben (und 2 ml Äthanol p.A. und 0,25 ml Leerwert-Reagenz zu den Probenleerwerten) erfolgte die Extinktionsmessung mit dem Zeiss-Spektralphotometer der Proben gegen die Probenleerwerte bei $\lambda = 535 \text{ nm}$, $d = 2 \text{ cm}$. Eichmessungen mit einem Glucosamin-Standard ergaben eine linear ansteigende Eichkurve von 0,0023 - 0,1287 μMol .

Extinktionskoeffizient: $E_{\mu\text{Mol}} = 12,80 E \pm 0,42 \quad \begin{matrix} 535 \text{ nm} \\ d=2 \text{ cm} \end{matrix}$

2.6.4. Bestimmung des Gesamtproteins mittels der Biuret-Reaktion modifiziert nach (20)

Benötigte Reagenzien:

Trichloressigsäure p.A. 12,43 g auf 100 ml bidest. Wasser (0,66M).

Biuret-Reagenz: Stamm-Lösung: 4,5 g Kalium-Natrium-Tartrat p.A. werden mit 40 ml 0,2N Natronlauge gelöst. Unter starkem Rühren 1,5 g Kupfersulfat zusetzen. Nach der Zugabe von 0,5 g Kalium-Jodid mit 0,2N Natronlauge auf 100 ml auffüllen.

Verdünnungslösung: 5 g Kalium-Jodid mit 0,2N Natronlauge auf 1000 ml auffüllen. Biuret-Reagenz: 20,1 ml Stamm-Lösung mit Verdünnungs-Lösung auf 100,0 ml auffüllen. Physiologische Natrium-Chlorid-Lösung (0,154M). Protein-Stammlösung: 100 mg Rinderalbumin (Behring-Werke, Marburg) als Standard auf 100 ml bidest. Wasser.

Ansatz für Enteiweißung: 0,5 ml Probevolumen

0,5 ml 0,66M Trichloressigsäure

Reaktionsansatz: Präzipitat

1 ml Biuret-Reagenz

1 ml 0,154M NaCl-Lösung (nur Probenleerwert)

Ausführung mit dem Eppendorf-Mikrolitersystem: Zu 0,5 ml Probevolumen (Probe bzw 0,154M NaCl-Lösung) gibt man 0,5 ml eiskalte 0,66M Trichloressigsäure hinzu und läßt die Proben im Rüttler 10 min mischen. Anschließend wird 2 min bei 15 000 Upm zentrifugiert, der Überstand vollständig dekantiert und verworfen. Das Präzipitat versetzt man mit 1 ml Biuret-Gebrauchslösung, läßt 2 min rütteln und anschließend 30 min stehen. Danach wird die Extinktion im Eppendorf-Photometer gegen Luft bei $\lambda = 546 \text{ nm}$ und einer Schichtdicke von $d = 2 \text{ cm}$ gemessen. Die Eichkurve mit Rinderalbumin ist bis zu einem Einsatz von 1,0 mg linear. Der Extinktionskoeffizient beträgt:

$$1 \text{ mg} \hat{=} 0,465 E \frac{2 \text{ cm}}{546 \text{ nm}}$$

Bei der Untersuchung von Urinkonzentraten erweist es sich als erforderlich, je Probe einen Probenleerwert anzusetzen: Verfahren wie bei den Proben, lediglich anstelle von 1 ml Biuret-Gebrauchslösung wird 1 ml physiologische Kochsalzlösung zugesetzt.

2.6.5. Bestimmung von Sulfatestern mittels der Benzidin-Reaktion

Die Sulfatester in entsalzten Urinfraktionen wurden nach hydrolytischer Abspaltung mit einer modifizierten Benzidinmethode (KLEINE et al., 17) gemessen.

Benötigte Reagenzien (bezogen von Fa. E. Merck, Darmstadt):
Benzidin p.A. 1 g in 100 ml absolutem Äthanol p.A. (unmittelbar vor Gebrauch angesetzt).

1N HC 1 p.A.

0,2 g NaNO_2 p.A. in 100 ml bidest. Wasser gelöst.

Thymol 0,5 g auf 100 ml 1,875M NaOH.

Sulfatfreier Glassand p.A.

7,95M HCOOH p.A.

1 mM Na_2SO_4 p.A. als wäßriger Standard.

Hydrolyseansatz: 1 ml Probevolumen

0,6 ml 7,95N HCOOH

0,4 ml bidest. Wasser

Reaktionsansatz: 1,5 ml Hydrolysenansatz

3,75 ml Benzidin-Lösung

1,25 ml 1 N HCl

0,1 g Glassand

0,5 ml NaNO_2 -Lösung (s. oben)

2,0 ml Thymol-NaOH-Lösung (s. oben)

Ausführung: Die Proben wurden nach Zuschmelzen der Reagenzgläser zehn Stunden bei 100°C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse besaßen die Proben eine grau-braune Färbung. Diese Färbung verschwand bei der nachfolgend beschriebenen Benzidin-Fällung wieder, so daß keine Probenleerwerte angesetzt werden mußten. Für die zu jedem Ansatz neu aufgestellte Eichkurve gilt der gleiche Ansatz, allerdings ohne Hydrolyse. Dem Hydrolysenansatz entnimmt man je 1,5 ml, versetzt sie mit 3,75 ml Benzidin-Lösung und mischt gut. Nach 2-stündigem Stehen im Eisbad werden die Proben mit einer Spatelspitze Glassand durchmischt, anschließend

im Kühlraum 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und verworfen. Dann stellt man die Gläser umgekehrt fünf bis zehn Minuten auf Filterpapier. Die Öffnungen der Gläser werden mittels Filterpapier außen mit Aceton, innen mit Äthanolgetränkten Watteträgern ausgewischt, um das am Glasrand befindliche Benzidin zu entfernen. Die Niederschläge werden mit 9 ml kaltem Äthanol p.A. gewaschen, wieder bei Zimmertemperatur in 2,1 ml 1N HCl aufgenommen und mit 1 ml NaNO_2 -Lösung und 4 ml Thymol-NaOH-Lösung versetzt. Nach erneutem 10 min Zentrifugieren bei 6000 Upm werden die klaren roten Überstände mit bidest. Wasser im Verhältnis 1 : 9 verdünnt. Die Extinktion der Rotfärbung wird gegen den Leerwert mit dem Zeiss-Spektralphotometer ($\lambda = 490 \text{ nm}$, $d = 1 \text{ cm}$) gemessen. Die Eichbestimmungen ergeben eine linear ansteigende Eichkurve.

Extinktionskoeffizient: $E_{\mu\text{Mol}} = 0,6102 \pm 0,0328 E_{\substack{490 \text{ nm} \\ d=1 \text{ cm}}}$

2.6.6. Messung von Kreatinin im Urin

Der Kreatiningehalt des Urins wird in Verdünnungen von 1/20 und 1/50 (Urin/aqua bidest.) mit dem Auto-Analyser (Technicon AA I mit Dialyse) mittels folgenden Reagenzien bestimmt: gesättigter Pikronsäure, 0,5M NaCl, 0,15M NaCl, Kreatininstandard (1 g/l).

3. E r g e b n i s s e

3.1. Zusammensetzung und Ausbeute von Bestandteilen des Urins

Die Zusammensetzung des Sammelurins dreier verschiedener Altersgruppen unterscheidet sich wie folgt (Tab. 1a): Zwischen 1. und 30. Lebensjahr nimmt Carbazol-positives Material 2- bis 3-fach und der Kreatiningehalt 5-fach zu, während das Biuretprotein um mehr als das 5-Fache abnimmt. Dagegen zeigt die Konzentration von Hexosaminen und Orcinol-positivem Material keine eindeutige Altersabhängigkeit. Bezogen auf die Kreatinin-Konzentration im Urin (Tab. 1b) nimmt der Gehalt an Carbazol- bzw. Orcinol-positivem Material, an Hexosaminen und an Biuretprotein zwischen 1. und 30. Lebensjahr deutlich ab: 2- bzw. 5-fach, für Biuretprotein 7- bis 27-fach.

Der Orcinol/Carbazol-Quotient kann eine weitere Charakterisierung der Urinbestandteile geben, wenn er mit demjenigen von reinen Standardsubstanzen (Tab. 1c) verglichen wird: Nur Dermatansulfat zeigt einen annähernd vergleichbaren hohen Wert (2,04), so daß auf das Vorhandensein anderer Zuckerverbindungen geschlossen werden muß besonders im Urin der Charge III.

Wie aus Abb. 1 und Tabelle 2 hervorgeht, wird aus der Urintrockenmasse zwischen 80 und 90 % an Carbazol- und Orcinol-positivem Material sowie an Hexosaminen extrahiert bezogen auf den Ausgangsurin. Etwas größer ist noch die Ausbeute an Biuretprotein. Da weniger als 1% dieser Bestandteile im Rückstand (Sediment) verbleiben, muß mit einem Verlust von 5 bis 20 % der untersuchten Bestandteile während der Aufarbeitungsprozedur gerechnet werden.

Parameter	Urin Charge I (20-30 Jahre)	Urin Charge II (10-20 Jahre)	Urin Charge III (1 -10 Jahre)
Carbazol positives Material ⁺ (μ Mole/l)	2306	1104	948
Orcinol positives Material ⁺ (μ Mole/l)	7178	4015	7625
Hexosamine (μ Mole/l)	1140	571	1141
Biuret-Protein (mg/l)	27	54	149
Creatinin (μ Mol/l)	17,7	9,5	3,6

Tabelle 1 a: Bestandteile verschiedener Urinchargen in Abhängigkeit vom Alter

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

Parameter	Urin Charge I (20-30 Jahre)	Urin Charge II (10-20 Jahre)	Urin Charge III (1-10 Jahre)
<u>Orcinol</u> <u>Carbazol</u>	3,1	3,6	8,1
<u>Carbazol</u> <u>Creatinin</u>	130	116	263
<u>Orcinol</u> <u>Creatinin</u>	406	423	2118
<u>Hexosamine</u> <u>Creatinin</u>	64	60	316
<u>Biuret-Protein</u> <u>Creatinin</u>	1,5	5,7	41,4

Tabelle 1 b: Molare Korrelation verschiedener Urinbestandteile
in Abhängigkeit vom Alter

Substanz	<u>Orcinol</u> <u>Carbazol</u>
Chondroitin-4-sulfat	0,45
Chondroitin-6-sulfat	0,43
Dermatansulfat	2,04
Hyaluronsäure	0,54
Keratansaft	1,15
Heparansulfat	0,75

Tabelle 1 c: Molarer Orcinol/Carbazol-Quotient
verschiedener Standards von
Glycosaminoglycanen

Die Glycosaminoglycan-Standards wurden bezogen
von Fa. Miles-Seravac, Lausanne, Schweiz
bzw. Serva, Heidelberg oder waren ein Geschenk
von Dr. A. Dorfman, Chicago, Ill., USA.

Urin Charge	Fraktion	Carbazol positives Material $\mu\text{mole}^+/\text{l}$	Orcinol positives Material $\mu\text{mole}^+/\text{l}$	Hexosamine $\mu\text{mole}/\text{l}$	Biuret-Protein mg/l
I	Ausgang	2306	7178	1140	27,1
	Extrakt	2023	6148	996	26,0
	Rückstand	18,4	54,6	9,1	-
II	Ausgang	1104	4015	571	53,6
	Extrakt	875	3067	564	51,8
	Rückstand	9,5	30	2,5	-
III	Ausgang	948	7625	1141	149
	Extrakt	760	6481	1035	142
	Rückstand	10,5	65	9,8	-

Tabelle 2: Ausbeute verschiedener Bestandteile bei Anreicherung von Sammelurin

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

3.2. Fraktionierung von Urinextrakt auf Sephadex
G-75 und Charakterisierung der erhaltenen
Fraktionen

200 ml Urinextrakt der Chargen I und II wurden auf Sephadex G-75 nach Molekülgrößen in 6 bis 7 Fraktionen aufgetrennt (Abb. 4, 5) bei einer Ausbeute von 12 bzw. 20 % und Carbazol- sowie Orcinol-positives Material gemessen (Tab. 3, 4). Es wurden nur die Fraktionen gesammelt und weiter analysiert mit einem Elutionsvolumen zwischen 980 bis 2340 ml (Abb. 4, 5) und einem errechneten Molekulargewicht zwischen 100 000 und 6 000 (vgl. 35 bei überwiegender Zugrundelegung von Proteinen bekannten Molekulargewichtes zur Eichung der Säule s. Abb. 3b). Die in diesem Trennbereich isolierten Fraktionen machen nur 1,8 % (Charge I) und 3,9 % (Charge II) des gesamten Carbazol-positiven Materials im Urin aus!

Von der Urincharge I wurden fünf Fraktionen isoliert, die z.T. in 2 bis 3 Unterfraktionen nach ihrem Orcinol/Carbazol-Quotienten und der Extinktion bei 280 nm unterteilt wurden (Abb. 4, Tab. 3). Die Urincharge II wurde in sechs Fraktionen separiert (Abb. 5, Tab. 4). Das gemessene Carbazol- und Orcinol-positive Material verteilt sich jedoch nicht gleichartig in den Fraktionen der Urincharge I und II. Dabei fällt auf, daß höhermolekulares Material in den Fraktionen I - III Orcinol/Carbazol-Quotienten aufweisen, die denen von Keratansulfat- und Dermatansulfat-Standards (Tab. 1c) ähneln. Niedermolekulares Material (Fraktion III B, IV - VI) hat Orcinol/Carbazol-Quotienten zwischen 3 und 7 (Tab. 3, 4).

E_{280}

A) Urin der Charge II

farblos

farbig

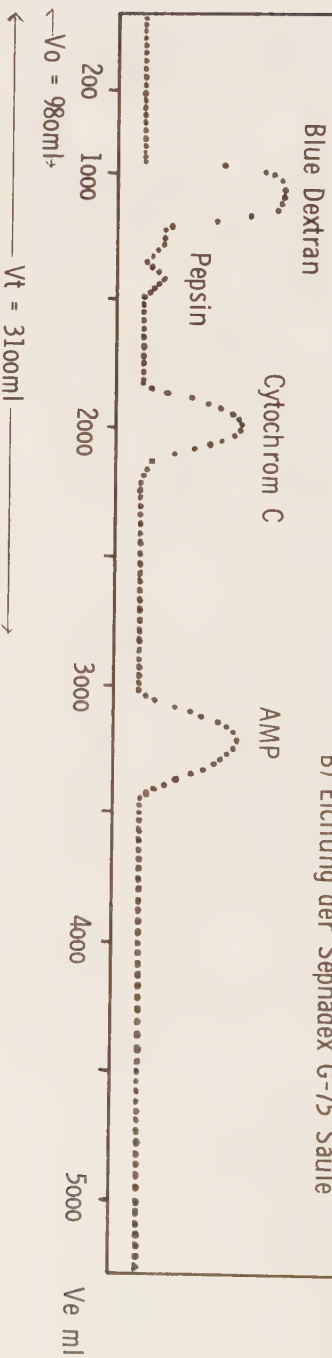


ABB. 3A, B: ELUTIONSDIAGRAMME DER SEPHADEX G-75 SÄULE AUFGEZEICHNET BEI E_{280}
 Weitere Einzelheiten siehe Methodik.

ABB. 4: ELUTIONSDIAGRAMM VON URINEXTRAKT VON DER
CHARGE I AUF SEPHADEX G-75

Weitere Einzelheiten siehe Methodik

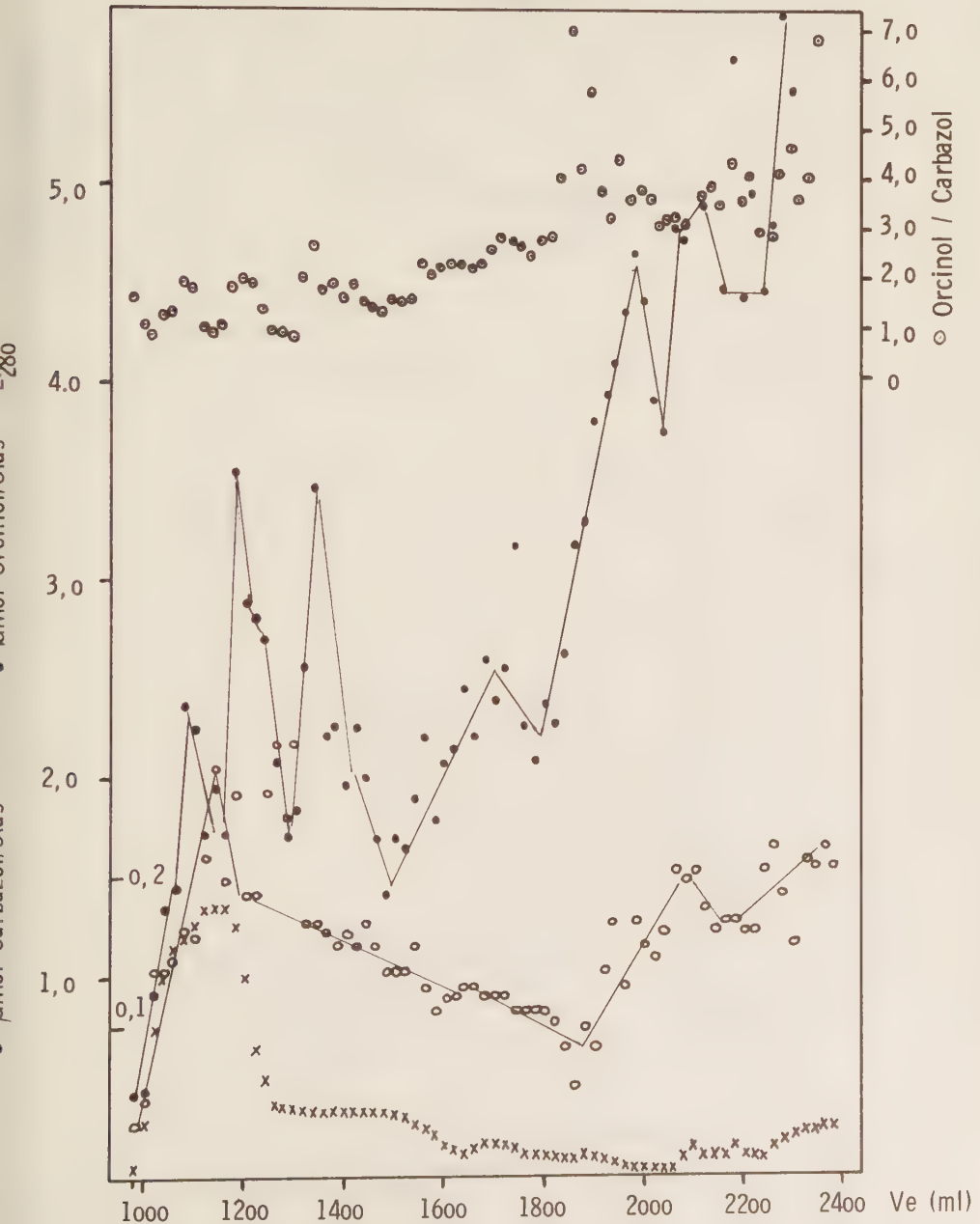
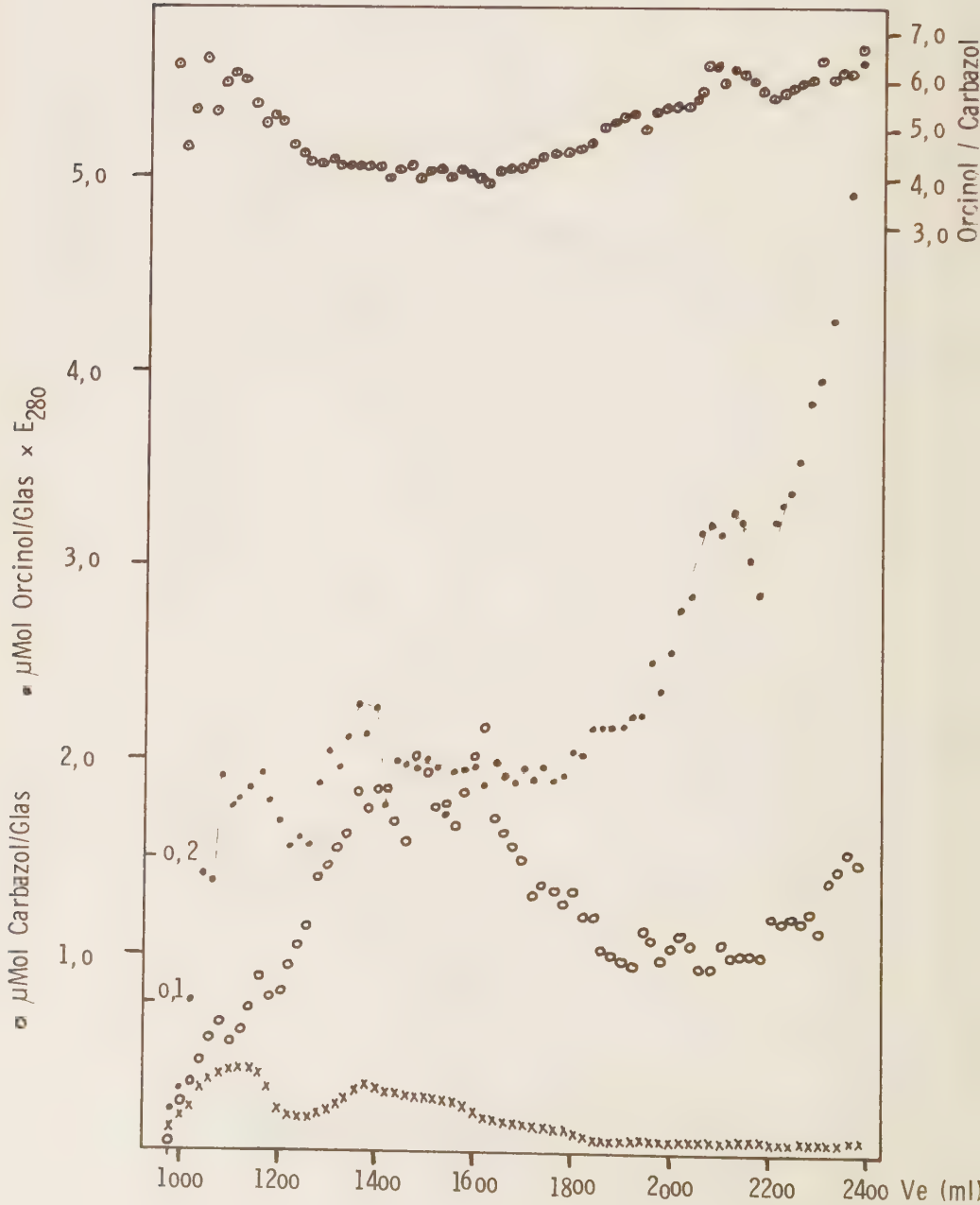


ABB. 5 ELUTIONSDIAGRAMM VON URINEXTRAKT VON DER CHARGE II AUF SEPHADEX G-75.

Weitere Einzelheiten siehe Methodik



Fraktion	Elutionsvolumen V _e (ml)	Molekulargewicht errechnet	Carbazol positives Material μMole ⁺	Orcinol positives Material μMole ⁺	Orcinol Carbazol
F I A	980 1180	> 100000	28,7	36,6	1,7 1,8
F I B	1200 1240	49000 45000	11,9	23,1	2,0 1,4
F II A	1260 1320	43400 38900	20,3	20,8	1,0 2,0
F II B	1340 1460	37500 30200	18,3	37,0	2,7 1,5
F II C	1480 1640	29200 21800	16,7	26,0	1,4 2,4
F III A	1660 1840	21100 15200	30,9	89,5	2,3 4,1
F III B	1860 1980	14700 11800	17,7	75,3	7,1 3,6
F IV	2000 2140	11400 8900	23,5	78,0	3,8 3,9
F V	2160 2340	8600 6200	39,9	142,2	3,5 4,0

Tabelle 3: Fraktionierung von Urinextrakt der Charge I auf Sephadex G-75 und Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen

Weitere Einzelheiten siehe Abb. 4

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

Fraktion	Elutionsvolumen V _e (ml)	Molekulargewicht errechnet	Carbazol positives Material μMole ⁺	Orcinol positives Material μMole ⁺	Orcinol Carbazol
F I	980 1240	>100000 45000	17,7	44,4	3,3 1,5
F II	1260 1640	43400 21800	90,6	104,4	1,3 1,2
F III	1660 1980	21100 11800	39,8	74,5	1,2 2,4
F IV	2000 2140	11400 8900	26,0	81,5	2,5 3,2
F V	2160 2340	8600 6200	15,0	49,9	3,0 3,2
F VI	2360	~6000	31,5	113,0	3,2

Tabelle 4: Fraktionierung von Urinextrakt der Charge II auf Sephadex G-75 und Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen

Weitere Einzelheiten siehe Abb. 5

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

3.3. Auftrennung und Charakterisierung von chromatographisch getrennten Urinfraktionen im CsCl-Dichtegradienten

Zur weiteren Charakterisierung der mittels Molekularsieb-chromatographie nach Molekülgröße aufgetrennten Urinfraktionen (vgl. Abb. 4, 5) werden dieselben im CsCl-Dichtegradienten nach ihrer "Schwere" bzw. "Dichte" in weitere 3 bis 4 Fraktionen unterteilt (Abb. 6 - 2o) und die erhaltenen Fraktionen nach Entsalzung mittels Orcinol/Carbazol-Quotienten und Sulfatestergehalt (molarer SO_4^{2-} /Carbazol-Quotient) charakterisiert (Tab. 5a, b, 6).

In beiden hochmolekularen Fraktionen F I der Chargen I und II entfällt ungefähr die Hälfte an Carbazol-positiven Material auf leichtes Material mit einem Carbazol/Orcinol-Quotienten zwischen 2 bis 4. Es ist bei Charge II gleichmäßig sulfatiert (SO_4^{2-} /Carbazol ~ 1 , Tab. 6). Mittelschweres Material zeigt einen Carbazol/Orcinol-Quotienten um 2, schweres Material um 1. Damit haben die Carbazol/Orcinol-Quotienten dieser beiden Subfraktionen Ähnlichkeit mit denjenigen von Keratansulfat bzw. einer Mischung von Dermatan-sulfat und Chondroitinsulfat (Tab. 1c).

Die mittelmolekulare Fraktion F II enthält in beiden Chargen I und II mehr schwereres Carbazol- und Orcinol-positives Material, das vor der Entsalzung z.T. andere Werte aufweist, was auf Salzfehler bei den Bestimmungsmethoden bzw. auf Entfernung von Orcinol-positives Material durch die Entsalzung zurückgeführt werden kann (Tab. 5, 6). Die leichtere Unterfraktion im Dichtegradienten zeigt einen etwas höheren Carbazol/Orcinol-Quotienten auf (1,5 - 2,0) als schwerere Unterfraktionen (Carbazol/Orcinol-Quotient 0,7 - 1,5). Leichtere Unterfraktionen haben einen relativ geringeren Sulfatgehalt (SO_4^{2-} /Carbazol) als schwerere Unterfraktionen (Tab. 5b, 6). Die Carbazol/Orcinol-Quotienten dieser drei Unterfraktionen ähneln solchen von Dermatan-sulfat bzw. Chondroitinsulfat und Keratansulfat (Tab. 1c).

Fraktion	Vor Entsalzung			Nach Entsalzung		
	Carbazol positives Material μMol^+	Orcinol positives Material μMol^+	Orcinol Carbazol	Carbazol positives Material μMol^+	Orcinol positives Material μMol^+	Orcinol Carbazol
F I A	1	4,62	26,07	6,51	27,36	4,2
	2	2,49	8,98	3,41	8,63	2,5
	3	2,34	4,86	2,01	2,63	1,3
F I B	1	1,24	6,06	1,83	4,89	2,7
	2	2,75	7,49	2,85	5,82	2,0
	3	4,98	7,05	1,83	6,36	1,4
F II A	1	1,43	3,49	1,37	2,50	1,8
	2	9,76	18,16	9,56	14,85	1,5
	3	4,69	6,31	3,88	4,41	1,1
F II B	1	2,40	5,33	2,08	3,06	1,5
	2	7,17	12,14	6,74	9,11	1,3
	3	3,42	4,76	2,79	3,12	1,1
F II C	1	2,47	4,78	1,04	2,03	1,9
	2	4,19	8,58	3,37	5,23	1,5
	3	3,08	5,11	6,47	8,03	1,1

Fraktion	V o r E n t s a l z u n g			N a c h E n t s a l z u n g		
	Carbazol positives Material μMol ⁺	Orcinol positives Material μMol ⁺	Orcinol Carbazol	Carbazol positives Material μMol ⁺	Orcinol positives Material μMol ⁺	Orcinol Carbazol
F III A	1	5,04	14,20	2,8	4,85	9,46
	2	12,64	27,61	2,2	11,23	21,61
	3	3,84	5,56	1,4	3,01	3,71
F III B	1	1,62	8,45	5,2	1,11	2,96
	2	5,64	23,25	4,1	4,99	13,94
	3	4,52	18,67	4,1	4,49	11,46
	4	1,04	2,64	2,5	2,88	5,14
F IV	1	2,31	36,24	15,6	4,16	13,22
	2	6,95	60,07	8,6	10,78	37,28
	3	2,06	18,76	9,1	2,78	7,45
	4	2,44	14,62	5,9	2,73	5,94
F V	1	9,32	62,59	6,7	10,31	30,32
	2	12,93	76,16	5,9	12,00	33,61
	3	13,59	81,10	5,9	14,27	43,15

Tabelle 5 a: Charakterisierung von chromatographisch getrennten Urinfraktionen der Charge I im CsCl-Dichtegradienten.

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

Fraktion	Carbazol positives Material μMol^+	Sulfat μMol	SO_4^{2-} Carbazol
F II B ₂	6,74	3,87	0,57
F II C ₃	6,47	5,54	0,86
F III A ₂	11,23	10,23	0,91
F III B ₂	4,94	3,47	0,70
F IV ₂	10,78	5,36	0,50
F V ₃	14,28	7,12	0,50

Tabelle 5 b : Weitere Charakterisierung von chromatographisch getrennten Urinfraktionen der Charge I im CsCl-Dichtegradienten nach Entsalzung.

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

Fraktion	Vor Entsalzung			Nach Entsalzung				SO ₄ - Carbazol
	Carbazol positives Material μMol+	Orcinol positives Material μMol+	Orcinol Carbazol μMol+	Carbazol positives Material μMol+	Orcinol positives Material μMol+	Orcinol Carbazol μMol	Sulfat μMol	
F I ₁	7,73	25,99	3,4	7,72	17,74	2,3	8,06	1,04
F I ₂	4,97	12,37	2,5	5,52	10,16	1,8	5,47	0,99
F I ₃	2,20	2,84	1,3	1,10	0,70	0,7	1,13	1,03
F II ₁	8,83	20,56	2,3	6,07	9,15	1,5	4,28	0,70
F II ₂	37,00	65,19	1,8	31,48	33,99	1,1	27,92	0,88
F II ₃	28,71	40,89	1,4	27,06	18,85	0,7	28,41	1,05
F III ₁	12,15	32,15	2,6	11,59	32,15	2,8	8,84	0,76
F III ₂	16,56	35,29	2,1	11,59	27,31	2,5	16,49	1,42
F III ₃	9,94	17,04	1,7	8,28	8,99	1,6	8,78	1,06
F IV ₁	8,83	29,11	3,3	7,18	19,96	2,8	7,40	1,03
F IV ₂	13,25	33,08	2,5	12,15	30,36	2,5	8,00	0,66
F IV ₃	3,86	8,89	2,3	4,41	7,15	1,6	3,23	0,73

Fraktion	V o r E n t s a l z u n g				N a c h E n t s a l z u n g				
	Carbazol positives Material µMol+	Orcinol positives Material µMol+	Orcinol Carbazol	Orcinol Carbazol	Carbazol positives Material µMol+	Orcinol positives Material µMol+	Orcinol Carbazol	Sulfat µMol	SO ₂ - Carbazol
F V ₁	3,86	10,39	2,7		2,76	6,75	2,4	1,57	0,57
F V ₂	4,41	10,74	2,4		3,86	8,88	2,3	2,32	0,60
F V ₃	2,20	5,27	2,4		1,10	2,29	2,1	0,63	0,57
F V ₄	2,76	4,12	1,5		2,20	4,07	1,8	1,57	0,71
F VI ₁	3,31	11,28	3,4		1,65	3,93	2,4	0,87	0,53
F VI ₂	6,07	19,52	3,2		5,52	13,93	2,5	3,16	0,57
F VI ₃	11,59	41,78	3,6		7,73	19,46	2,5	4,70	0,61
F VI ₄	6,07	19,82	3,3		7,73	24,47	3,4	4,39	0,57
(leicht farbig)									

Tabelle 6: Charakterisierung von chromatographisch getrennten Urinfraktionen der Charge II in CsCl-Dichtegradienten nach Entsalzung.
Weitere Einzelheiten s. Abb. 5.

⁺bezogen auf Glucuron-3,6-Lacton

Die niedermolekularen Fraktionen III und IV beider Urinchargen I und II trennen sich im Dichtegradienten in Unterfraktionen auf, von denen die mengenmäßig überwiegenden leichteren höhere Carbazol/Orcinol-Quotienten (2 - 3) aufweisen als entsprechende der Fraktion II (1 - 1,5). Nur die mengenmäßig geringen schwersten Subfraktionen von F III und F IV zeigen Carbazol/Orcinol-Quotienten von der Größenordnung des Dermatansulfat-Standards (s. Tab. 1c). Bei Material von F III hat die leichtere einen niedrigeren Sulfatgehalt im Vergleich zu schwereren, bei Material von F IV haben die schwereren Unterfraktionen relativ weniger Sulfat als leichtere zumindest für Urincharge II.

Die niedermolekularen Fraktionen F V und VI (nur Charge II) weisen hauptsächlich leichte Unterfraktionen auf; die Carbazol/Orcinol-Quotienten aller Unterfraktionen liegen zwischen 2 - 3 (als höher als Dermatansulfat-Standard, s. Tab. 1c) und der Sulfatgehalt (SO_4^{2-} /Carbazol) ist durchweg 1,0.

ABB. 6, 7:

FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CSCI-DICHTE - GRADIENTEN

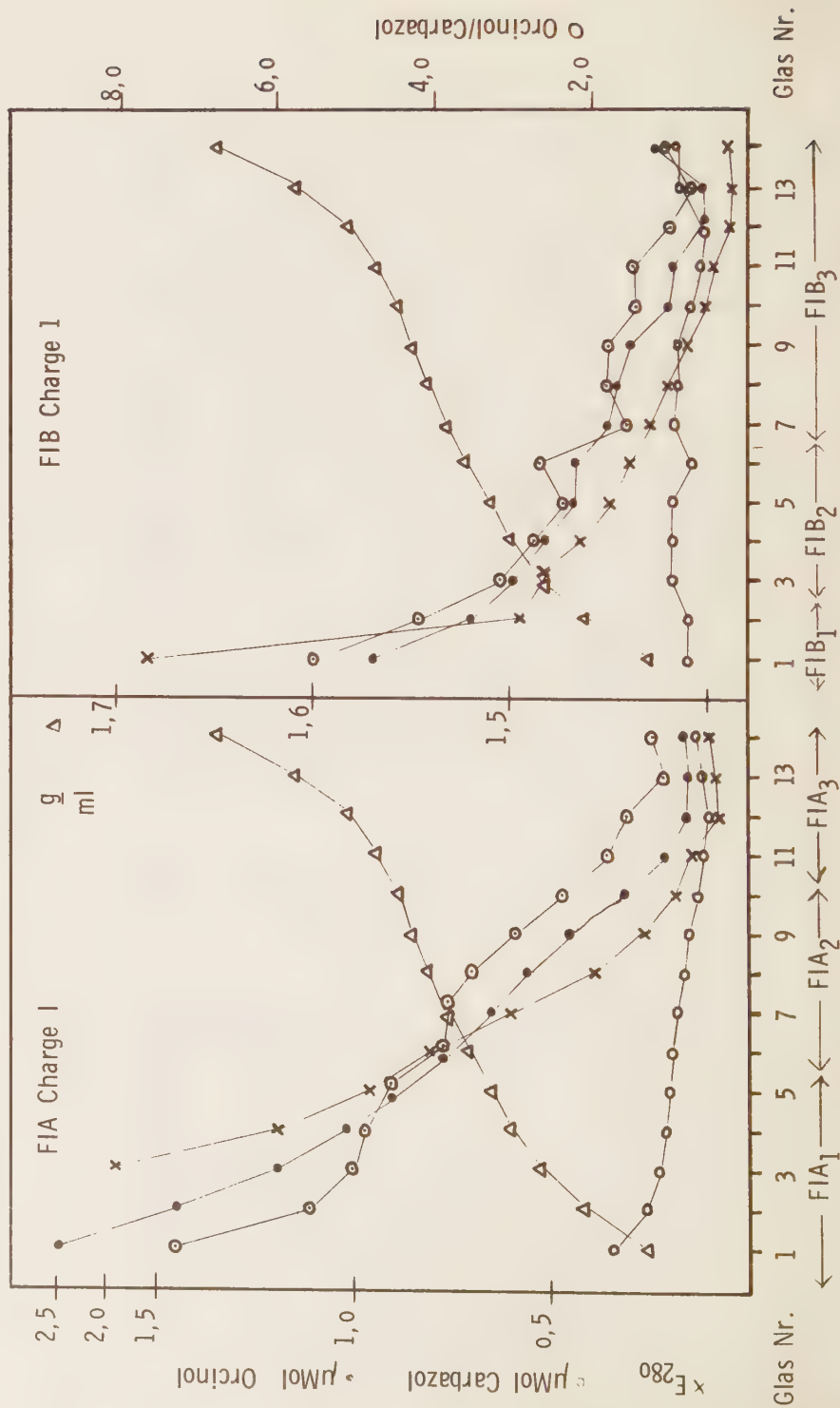


ABB. 8, 9: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CSCI-DICHTEGRADIENTEN

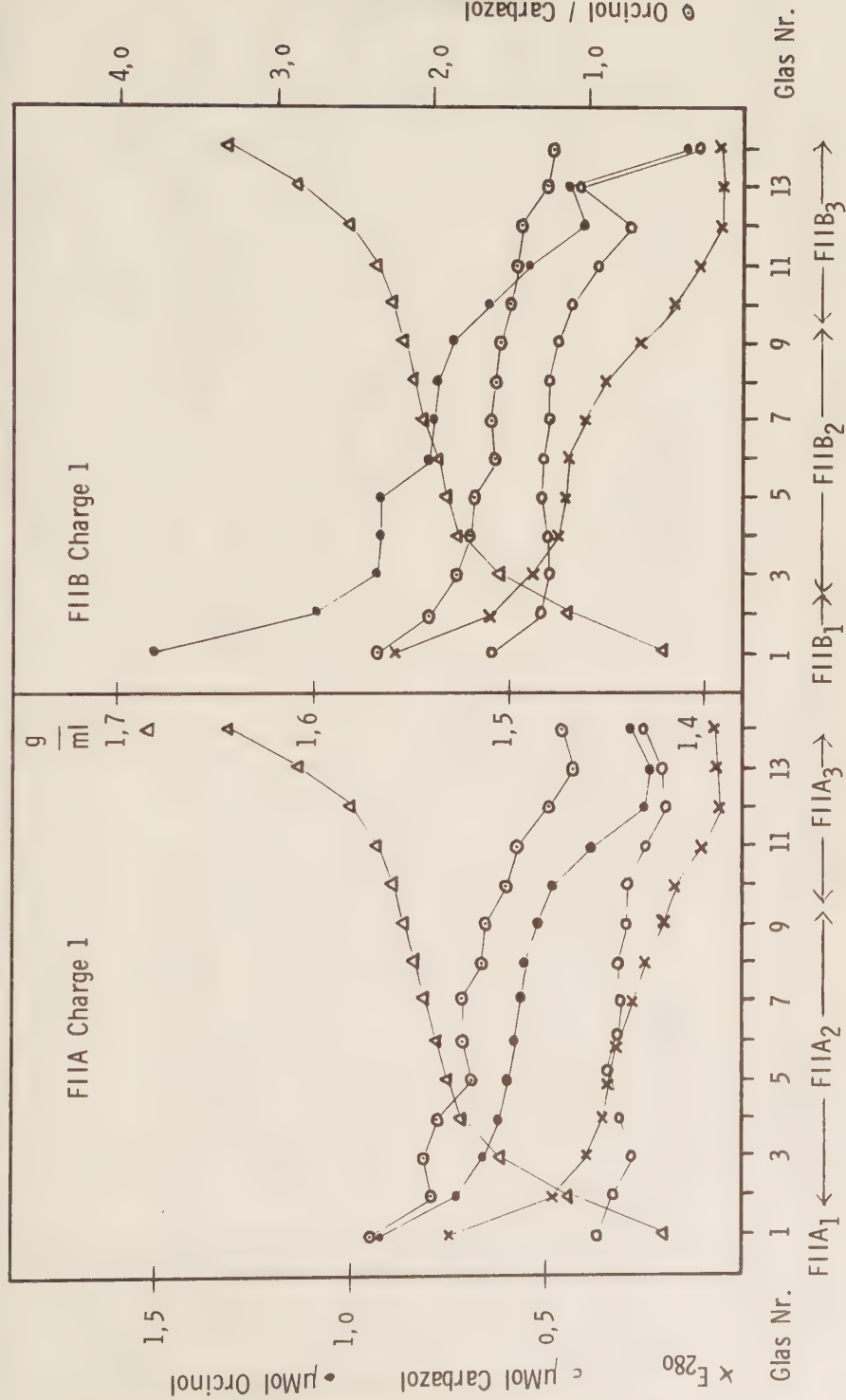


ABB.: 10, 11: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CsCl-DICHTE-GRADIENTEN

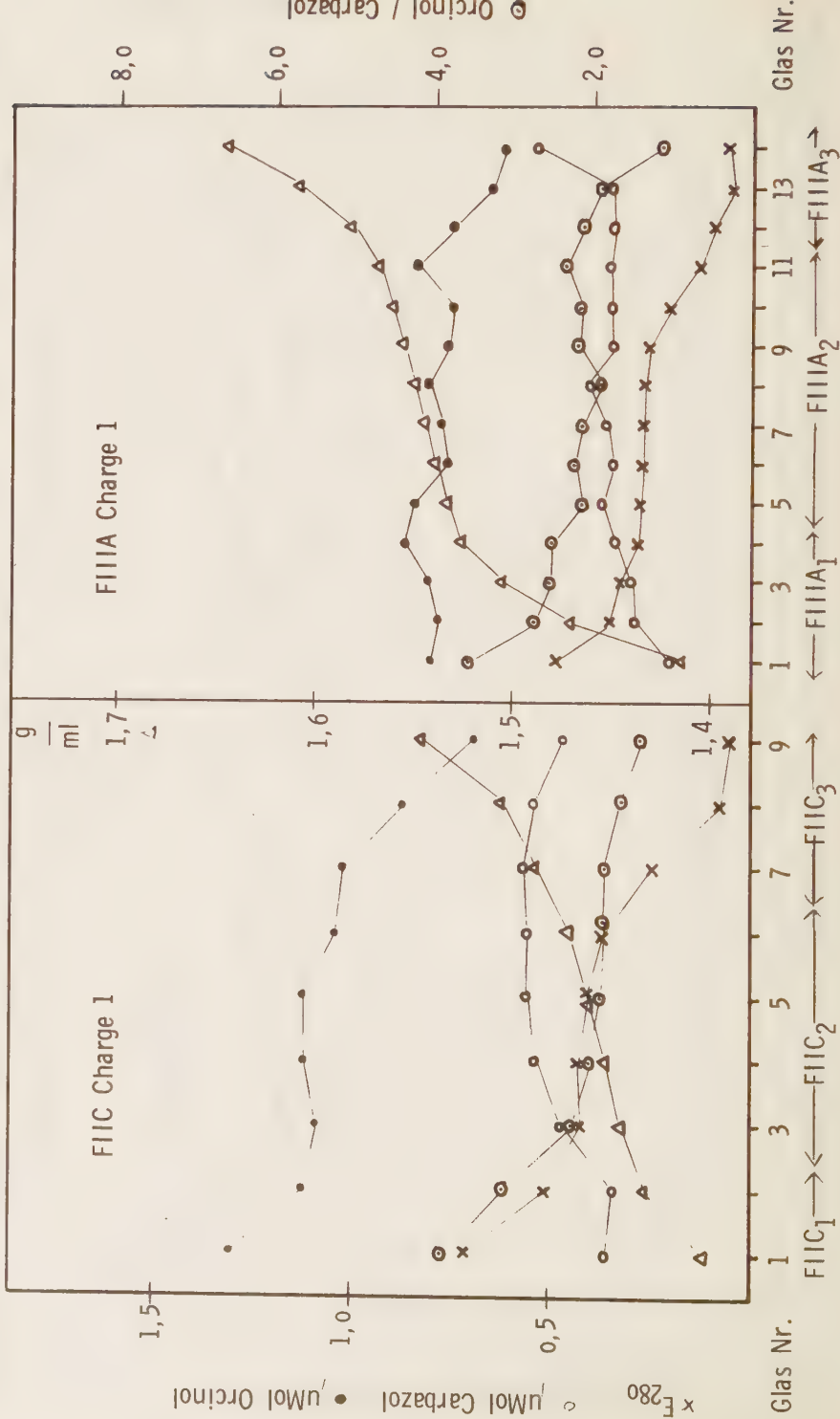


ABB. 12, 13: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CsCl-DICHTEGRADIENTEN

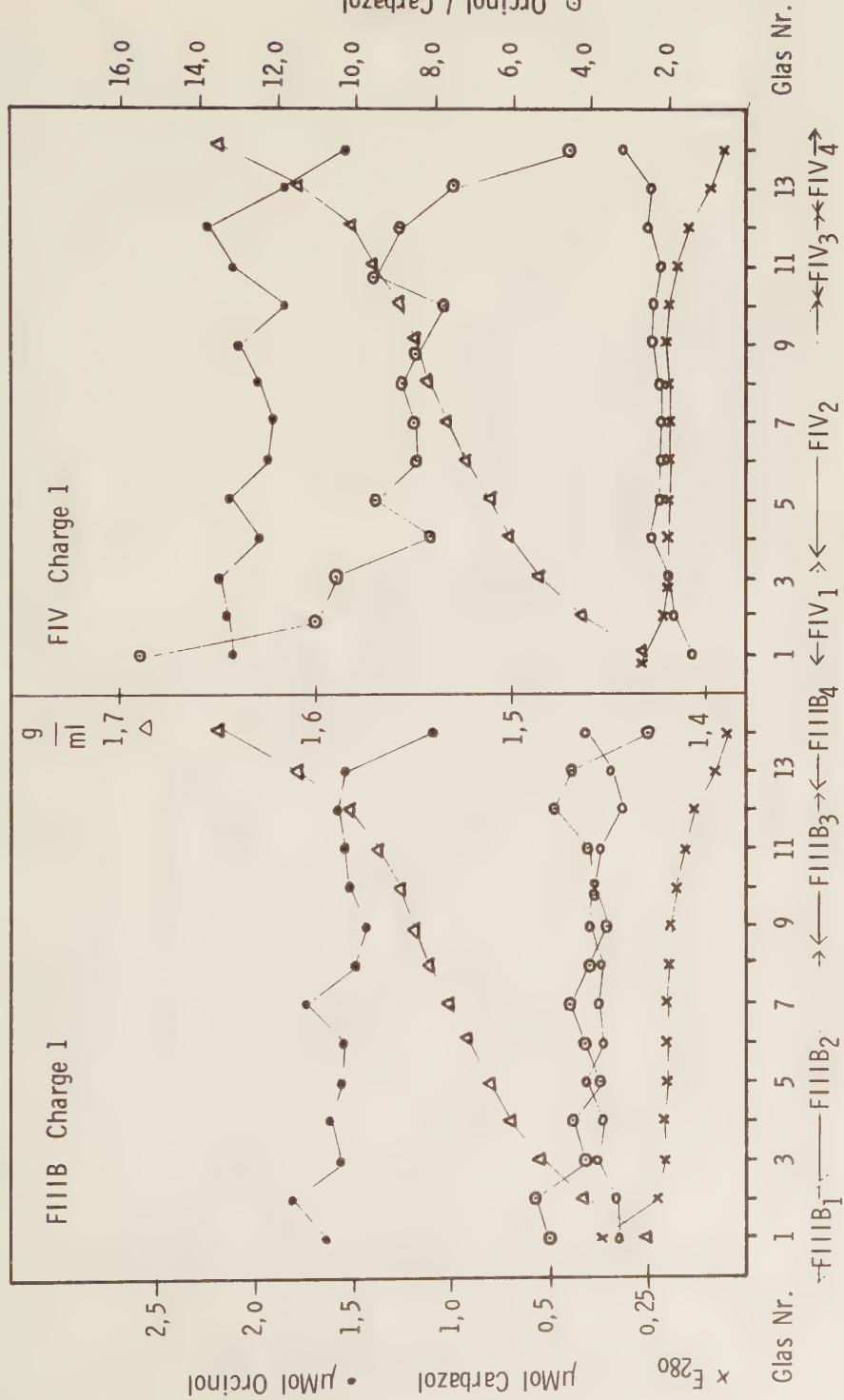


ABB. 14: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CsCl-DICHTEGRADIENTEN

Weitere Einzelheiten siehe Abb. 4 und Methodik

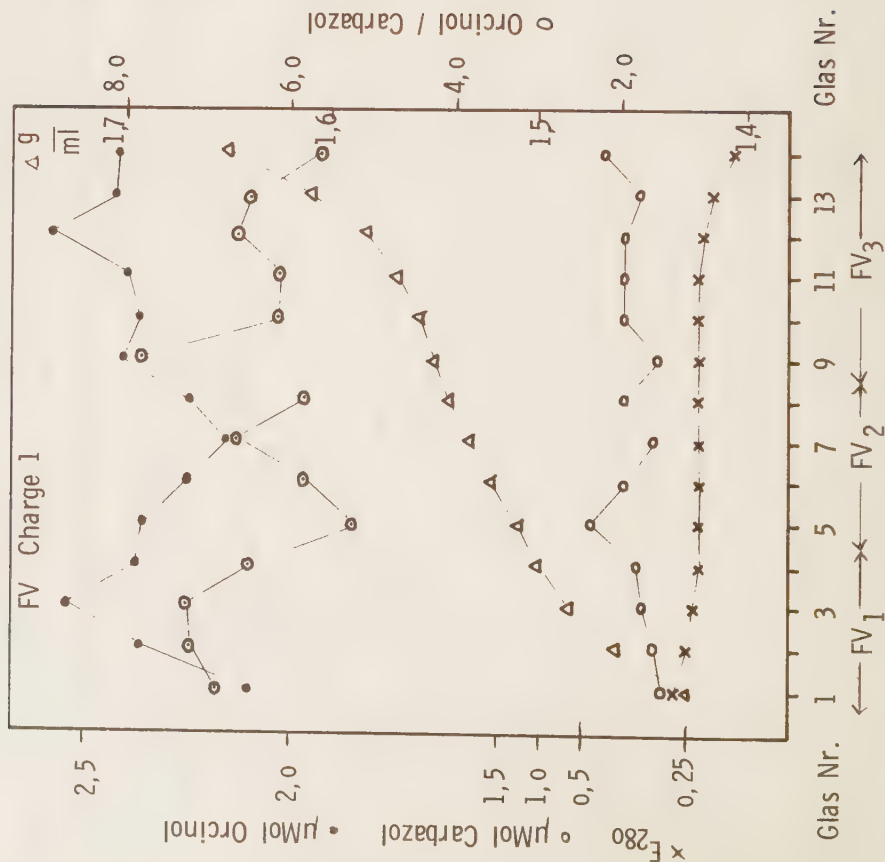


ABB. 15, 16: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CsCl-DICHTEGRADIENTEN

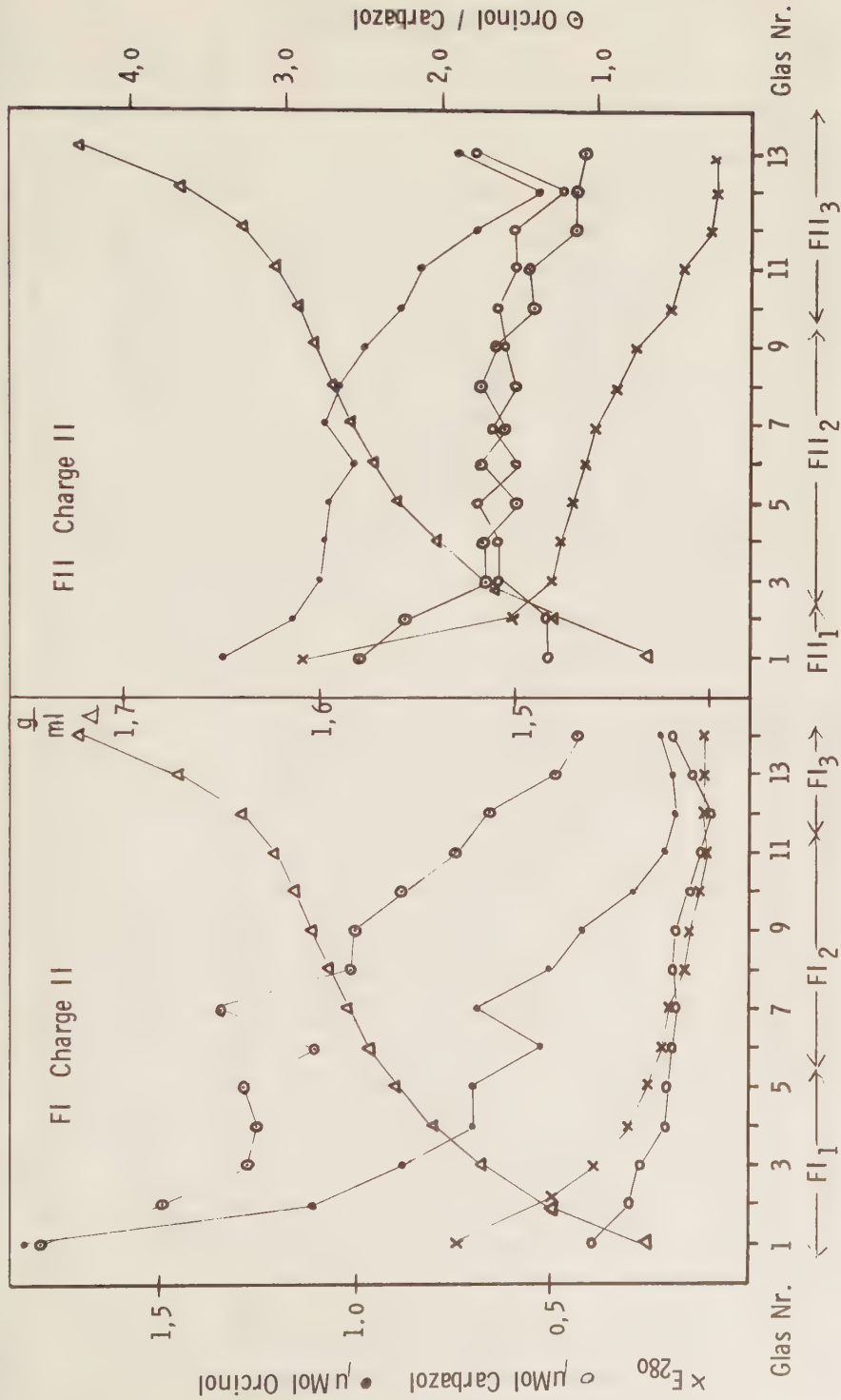


ABB. 17, 18: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CSCI-DICHTEGRADIENTEN

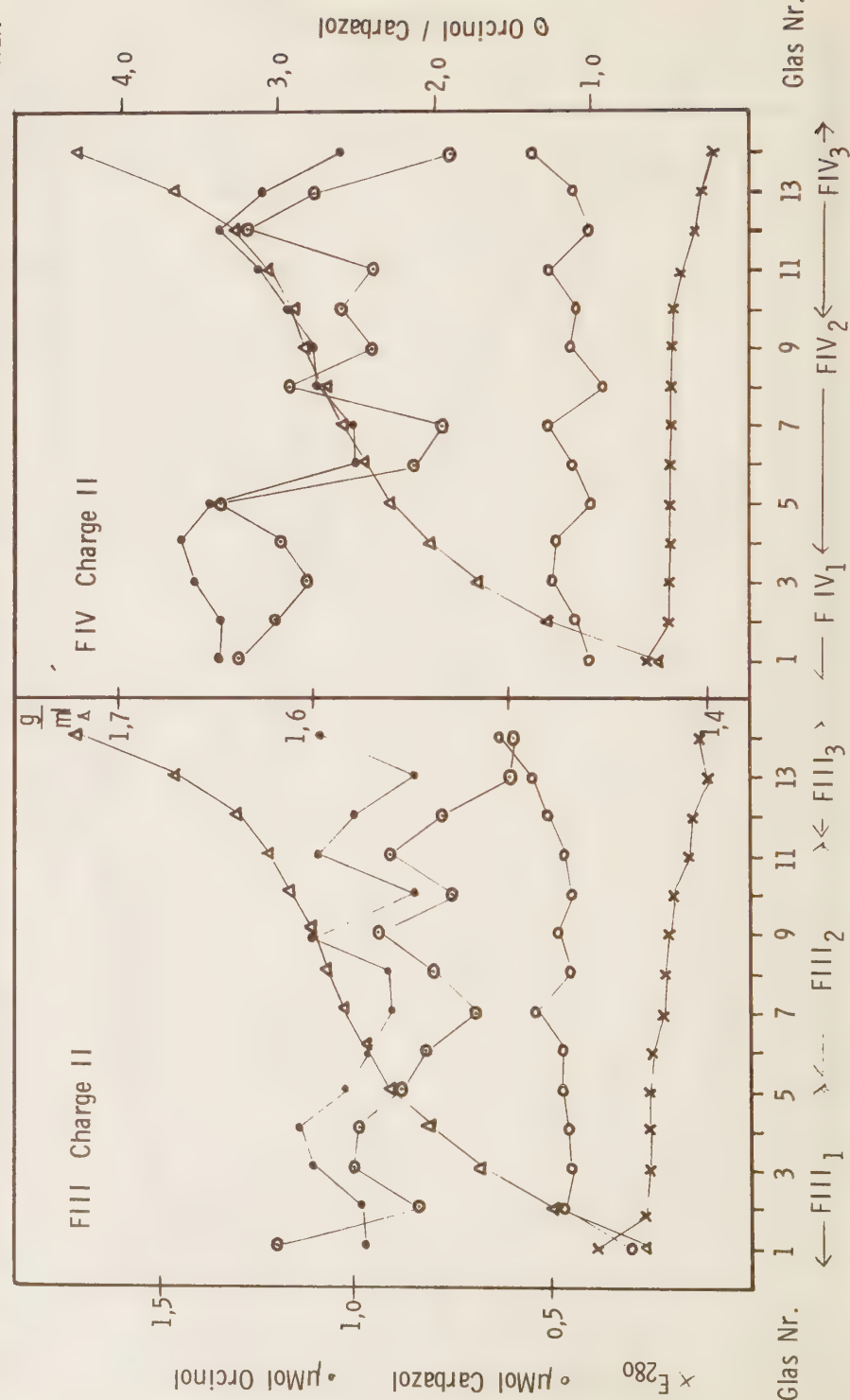
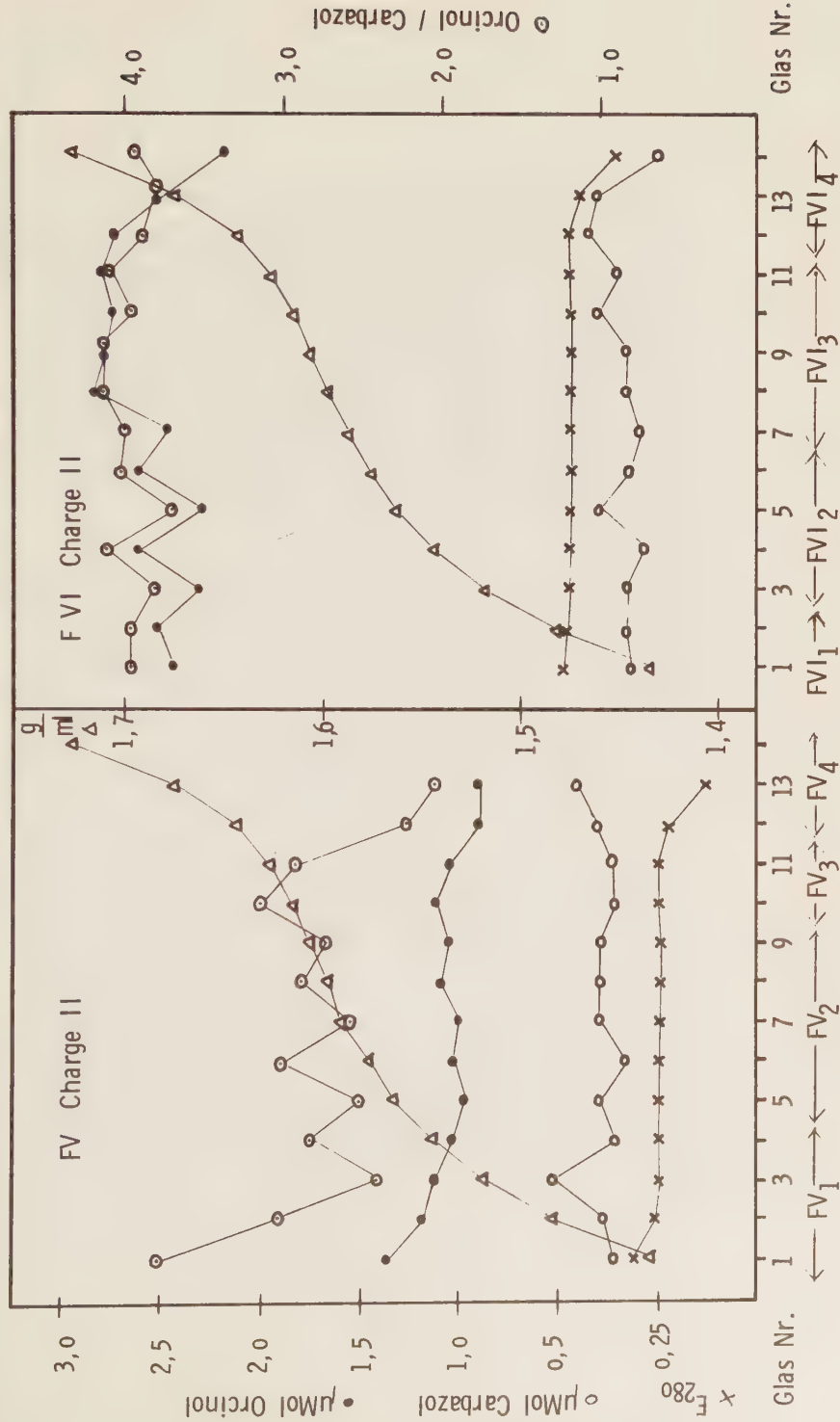


ABB. 19, 20: FRAKTIONIERUNG VON CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN URINFRAKTIONEN IM CSCI-DICHTEGRADIENTEN



Glas Nr.

Glas Nr.

4. D i s k u s s i o n

Im Urin von Erwachsenen werden täglich 1000 bis 3000 μMol Uronsäuren ausgeschieden (12), was auch in dieser Arbeit mit Hilfe der Carbazolreaktion bestätigt wird. Dabei zeigte sich die ausgeschiedene Menge an Carbazol-positivem Material vom Alter der untersuchten Personen abhängig. Jedoch scheinen mehr als 95 % des Carbazol-positiven Materials in niedermolekularer gebundener Form im menschlichen Urin vorzuliegen, z.B. an Steroide gebunden (14). Von den ausgeschiedenen Hexosaminen und Sialinsäure sind ca. 70 % dialysable und niedermolekular ($\text{M.W.} < 2000$) (34).

Die höher molekular-gebundenen Uronsäuren und Aminosucker sind Bausteine eines ganzen Spektrums verschieden großer, chemisch heterogener Glycosaminoglycane; hiervon sind sulfatiert: Chondroitin-6-sulfat (der Hauptanteil 50-60 % der Summe), Chondroitin-4-sulfat (28 %), Dermatansulfat (1 - 2 %), Heparansulfat (5 - 15 %) (11, 23, 25, 26, 28, 32, 34, 35) und geringe Mengen von Keratansulfat (8 - 18 %) (16, 23, 28, 35). Höher sulfatierte Glycosaminoglycane ($\text{SO}_4^{2-}/\text{Uronsäure} > 1.0$) kommen in geringen Mengen vor (21, 26, 33). Heparansulfat und Dermatansulfat scheinen im höheren Alter an Konzentration zuzunehmen (1, 31). Für die Chondroitinsulfatfraktionen wurde ein Molekulargewicht zwischen 8000 bis 13000 bestimmt, für die Heparansulfatfraktionen von 8000 bis 30000 (34). Im menschlichen Urin scheinen diese Glycosaminoglycane mit wechselnden Mengen von Proteinen zusammen vorzukommen (30). Geringe Mengen nicht sulfatierter Glycosaminoglycane sind außerdem isoliert worden: ca. 4 % Hyaluronsäure, ca. 2 - 10 % Chondroitin (10, 23, 26, 32, 34) mit einem mittleren Molekulargewicht von 8000 (34).

Weiterhin werden unterschiedlich große Glycoproteine und Glycopeptide gefunden, in welchen die Zucker Galactose, Xylose, Fucose, Mannose, Glucose oder Sialinsäure neben Aminosucker (Galactosamin, Glucosamin) und Glucuronsäure glycosidisch an einen Proteinkern gebunden sind (3, 4, 5, 8, 9, 15, 23). Daneben kommen geringe Mengen eines sehr großen Glycoproteins vor (Tamm-Horsfall, MG ca. $2 - 38 \times 10^6$) (5, 27). Inwiefern die isolierte Glycoproteinfraktion das Proteincore mit der Bindungsregion Xylose- Galactose- Galactose - Glucuronsäure (vgl. 22) von Glycosaminoglycanen enthält, muß hier offen bleiben.

In meinen Untersuchungen entfallen auf die höher molekularen Glycosaminoglycanfraktionen nur 1,8 % des gesamten Carbazol-positiven Materials der Urincharge I (20 - 30 Jahre) und 3,9 % der Charge II (10 - 20 Jahre). Diese zuerst nach Molekülgröße getrennten Fraktionen (Trennbereich 6000 - 100000) zeigen ein ganzes Spektrum unterschiedlich großer Substanzen, deren Orcinol/Carbazol-Quotient von 1 bis 4 mit abnehmender Molekülgröße ansteigt, was keine reinen Glycosaminoglycane, sondern Glycosaminoglycan-Glycoprotein-Gemische indizieren dürfte. Mittels weiterer Reinigung und Fraktionierung dieser Fraktionen im CsCl-Dichtegradienten können leichtere Glycoproteinartige Unterfraktionen mit teilweise geringem Sulfatgehalt von schweren sulfatreicheren Glycosaminoglycan-Unterfraktionen abgetrennt werden. Letztere haben einen Orcinol/Carbazol-Quotienten zwischen 1 und 2. Da der Anteil an Dermatansulfat und Keratansulfat im menschlichen Urin gering ist (23, 28, 35), müssen in diesen Subfraktionen neben sulfatierten Glycosaminoglycanen noch gleichschwere Glycoproteine bzw. nicht sulfatierte Glycosaminoglycane vorhanden sein. Weitere Strukturanalysen, z.B. mittels spezifisch abbauender Enzyme werden damit erforderlich, um eine eindeutige Zusammensetzung und Charakterisierung der isolierten höher molekularen Urinfraktionen zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Es wird eine neue Methode zur Anreicherung und Fraktionierung von Glycosaminoglycanen im menschlichen Urin beschrieben. Der gefriergetrocknete Urin wird mit 0,4M Guanidin-o,05M Na-Azetat.pH 5,8 extrahiert (Ausbeute 80 - 95 %); mittels Gelchromatographie (Sephadex G-75) wird der niedermolekulare farbige Anteil abgetrennt und der höhermolekulare Anteil nach Gehalt an Carbazol- und Orcinol-positivem Material fraktioniert. Diese Fraktionen werden - erstmalig hier beschrieben - im CsCl Dichtegradienten weiter unterteilt und teilweise charakterisiert. Es wird ein ganzes Spektrum verschieden großer und schwerer Substanzen isoliert mit unterschiedlichem Gehalt an Carbazol- und Orcinol-positivem Material sowie an Sulfat.

6. L i t e r a t u r

1. ALLALOUF, D., A. BER: The pattern of urinary glycosaminoglycan excretion in relation to age in man.
Biochim.Biophys.Acta 201, 61 (1970)
2. ANTONOPOULOS, C.A., S. GARDELL, J.A. SZIRMAI, E.R. de TYSSONSK: Determination for glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from tissue on the microgram scale.
Biochim.Biophys.Acta 83, 1 (1964)
3. BANERJEE, D.K., D. BASU: Isolation and partial characterization of glycopeptide from urine.
Indian J.Biochim.Biophys. 11, 141 (1974)
4. BASU, D.: Isolation of a crystalline glycopeptide from human urine.
Indian J.Biochim.Biophys. 8, 133 (1971)
5. BERGGARD, I: Studies on proteins, glycoproteins and mucopolysaccharides in normal human urine.
Acta Soc.Med.Upsal. 66, 230 (1961)
6. BITTER, T. and H.M. MUIR: A modified uronic acid carbazole reaction.
Analytical Biochemistry 4, 330 (1962)
7. BROWN, A.H.: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose.
Arch.Biochem. 11, 269 (1946)

8. CALATRONI, A., G. PALLAVICINI, A.A. CASTELLANI:
Aminosugar containing low molecular weight
acidic compounds present in urine of
normal children and 7 patients affected
by mucopolysaccharidosis type II, III
or IV.
Italian J.Biochem. 23, 183 (1974)
9. CARRION, A., R. BOURRILOU, J.A. CABEZAS: Préparation
et propriétés d'un sialoglycopeptide riche
en acide sialique de l'urine humaine
normale.
Clin.Chim.Acta 25, 351 (1969)
10. CHAKRAPANI, B., B.K. BACHHAWAT: Glucosaminoglycans
of human urine: part I - protein-poly-
saccharide linkage region in the non-
sulphated glycosaminoglycans of normal
urine.
Indian J.Biochem. 20, 9 (1968)
11. CHAKRAPANI, B., B.K. BACHHAWAT: Glycosaminoglycans
of human urine: part II - sulphated
glycosaminoglycans of normal adult urine.
Indian J. Biochem. 6, 166 (1969)
12. CORNILLLOT, P.: Détermination de l'acide glucuronique
dans les urines humaines normales et
pathologiques.
Clin.Chim. Acta 7, 42 (1962)
13. DETERMANN, H.: Gelchromatographie.
Springer, Berlin 1967

14. GOERTZ, G.R., O.C. CREPY, O.E. JUDAS, J.E. LONGCHAMPT, M.F. JAYLE: Separation des fractions sulfo- et glucurono-conjugées des stéroïdes urinaires: mise au point d'une méthode analytique.
Clin.Chim. Acta 51, 277 (1974)
15. HALLGREN, P., A. LUNDBLAD, S. SVENSSON: A new type of carbohydrate-protein linkage in a glycopeptide from normal human urine.
J.Biol.Chem. 250, 5312 (1975)
16. HUMBEL, R.: Identification and quantitation of keratan sulphate in urine.
Clin.Chim. Acta 52, 173 (1974)
17. KLEINE, T.O., H. HILZ: Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfatproteine I.: Charakterisierung der Protein-Polysaccharide aus Kälberrippenknorpel und ihre In-vitro-Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 1027 (1968)
18. KLEINE, T.O. H.J. KIRSIG, H. HILZ: On the biosynthesis of chondroitin sulfate proteins III. Metabolic and chemical heterogeneity in calf rib cartilage as revealed by CsCl gradient centrifugation and CPC-cellulose chromatography.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 479 (1971)

19. KLEINE, T.O., J. MÜSKE, H.W. TIMMERS: Isolierung von Glykosaminoglykanen aus menschlichem Urin mittels Gelchromatographie und CsCl-Gradientenzentrifugation. Hoppe-Seyler's, Z.Physiol.Chem. 353, 1536 (1972)
20. KLEINE, T.O., M. STROH, J. STROH: Zur Methodik der Proteinelektrophorese auf Celluloseacetat-folie im Liquor cerebrospinalis des Menschen. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 66 (1974)
21. LAGUNOFF, D., P. PRITZE, C.R. SCOTT: Urinary N-sulfate glycosaminoglycan excretion in children: normal and abnormal values. Proc.Soc.exper.Biol.Med. 126, 34 (1967)
22. LINDAHL, U., L. RODEN: The chondroitin-4-sulfate protein linkage. J.biol.Chem. 241, 2113 (1966)
23. MANLEY, G., M. SEVERN, J. HAWKSWORTH: Excretion pattern of glycosaminoglycans and glycoproteins in normal urine. J.Clin.Path. 21, 339 (1968)
24. MIETTINEN, T.A.: Fractionation of urinary mucosaccharides by gel filtration. Scand.J.Clin.Lab.Investigation 14, 380 (1962)
25. MURATA, K., T. ISHIKAWA, Y. OSHIMA: Enzymatic studies of urinary chondroitin sulfates in normal and systemic connective tissue disease states. Clin.Chim.Acta 28, 213 (1970)

26. MURATA, K., T. HARADA, T. FUJIWARA, T. FURUHASHI:
Chondroitin sulfate isomers in normal
human urine.
Biochim.Biophys.Acta 230, 583 (1971)
27. OLIVER, C.J., E.R. PIKE, A.J. CLEAVE, A.R. PEACOCKE:
Determination of the diffusion coefficient
and molecular weight of Tamm-Horsfell
glycoprotein by intensity fluctuation
spectroscopy.
Biopolymers 10, 1731 (1971)
28. ORII, T.: The urinary acid mucopolysaccharides in
normal male children.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 816
(1968)
29. SCHUBERT, M., D. HAMERMAN: A primer on connective
tissue biochemistry.
Lea + Febiger, Philadelphia. (1967)
30. STIDWORTHY, G.H., P.J. ELLIS, R.G. GOTTSCHALK:
Separation of sulfated urinary acid
mucopolysaccharides utilizing cetyltri-
methylammonium bromide and ethyl alcohol.
Proc.Soc.exper.Biol.Med. 112, 861 (1962)
31. TANIGUCHI, N: Age differences in the pattern of
urinary glycosaminoglycans excretion in
normal individuals.
Clin.Chim. Acta 37, 225 (1972)
32. VARADI, D.P., J.A. CIFONELLI, A. DORMAN: The acid
mucopolysaccharides in normal urine.
Biochim.Biophys. Acta 141, 103 (1967)

33. VARADI, D.P., C. GRIFFITHS: Oversulfated chondroitin sulfate in normal human urine.
Biochim.Biophys. Acta 230, 248 (1971)
34. WASTESON, A., E. WESSLER: Molecular size and xylose content of urinary glycosaminoglycans.
Biochim.Biophys. Acta 252, 13 (1971)
35. WESSLER, E.: The nature of the non-ultrafilterable glycosaminoglycans of normal human urine.
Biochem.J. 122, 373 (1971)

Meine akademischen Lehrer

in den vorklinischen Fächern:

Amon, Dimroth, Fischer, Heuser, Koeke, Mahr, Mattes,
Nöth, Petry, Pfütz, Rosemann, Stutte, Walcher;

in den klinischen Fächern:

Goebell, Havemann, Hennis, Hernig, Heuser, Janke,
Kleine, Koch, Korb, Niemeyer, Riecken, Rupec, Schiff,
Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnell, Seidel.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

"Isolierung von Glykosaminoglycanen aus menschlichem Urin mittels Gelchromatographie und CsCl-Gradientenzentrifugation"

im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Nervenklinik Marburg

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. T.O. Kleine ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Fachbereich Humanmedizin ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

Lebenslauf

Ich, Hans Werner Timmers, wurde als Sohn des Post-
oberamtmanns Johannes Timmers und seiner Ehefrau
Elisabeth Timmers, geborene Rasche, am 13. November
1947 in Essen geboren.

Von Ostern 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule
in Essen-Bergeborbeck, anschließend von 1958 bis 1967
das Jungengymnasium in Essen-Borbeck. Nach dem Abitur
im Juli 1967 studierte ich zwei Semester Naturwissen-
schaften an der Philipps-Universität in Marburg.

Zum Wintersemester 1968/69 begann ich an der gleichen
Universität das Zahnmedizinstudium. Dort legte ich 1969
das Vorphysikum, 1971 das Physikum und im Dezember 1973
das Staatsexamen ab.

Anschließend beendete ich den im Frühjahr 1972 begon-
nenen praktischen Teil meiner Doktorarbeit. Seit dem
16.4.1974 arbeite ich als Assistent beim Zahnarzt
Dr. Rolf Thiele in Herne. Mitte des Jahres 1977 werde
ich mich in eigener Praxis in Essen niederlassen.

